

EESTI MAAÜLIKOOL

Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Maribel Rohesalu

**PESTITSIIDIDE SULFOKSAFLOORI JA ASOKSÜSTROBIINI
MÕJU JA KOOSMÕJU KARUKIMALASE (*BOMBUS
TERRESTRIS* L.) TÖÖLISTELE**

**IMPACT OF SULFOXAFLOL AND AZOXYSTROBIN ON
BUMBLEBEE (*BOMBUS TERRESTRIS* L.) WORKERS**

Bakalaureusetöö

Aianduse õppekava

Juhendajad: Margret Jürison, Msc

Reet Karise, PhD

Tartu 2021

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Maribel Rohesalu		Õppekava: Aiandus	
Pealkiri: Pestitsiidide sulfoksafloori ja asoksüstrobiini mõju ja koosmõju karukimalase (<i>Bombus terrestris</i> L.) töölistele			
Lehekülgi: 38	Jooniseid: 5	Tabeleid: 1	Lisasid: 1
Osakond: Põllumajandus- ja keskkonnainstituut, Taimeterwise õppetool Uurimisvaldkond: CERCS B390 Juhendajad: Margret Jürison MSc, Reet Karise PhD Kaitsmiskoht ja aasta: Eesti Maaülikool 2021			
<p>Inimesed on arendanud mitmeid pestitsiide, mille tõttu on kaasnenud sõltuvus nende kasutamisele. Neonikotinoidid on osaliselt või täielikult keelustatud ja on uuritud erinevaid pestitsiide, mis neid suudaks asendada, üheks võimaluseks peetakse näiteks sulfoksafloori. Sellele kaasnevalt oleks vaja saada aimu, mida sulfoksafloor koos teiste põllul esinevate pestitsiididega mõjutavad.</p> <p>Töö eesmärgiks oli uurida sulfoksafloori ja asoksüstrobiini mõju ja koosmõju kimalaste suremusele ja toitumise muutusele ning teha kindlaks, kas nende ainete võimalik mõju üksteise toimele on mõlema uurimisküsimuse suhtes samasugune.</p> <p>Katsed viidi läbi Eesti Maaülikooli taimekaitse laboris. Katses kasutati karukimalaste (<i>Bombus terrestris</i>) töölisi, keda töödeldi individuaalselt erinevate lahustega, mis sisaldasid insektitsiidi sulfoksafloor ja fungitsiidi asoksüstrobiin ning nende segusid. Negatiivse kontrollina kasutati atsetooni ja positiivse kontrollina dimetoaati.</p> <p>Uuringust selgus, et asoksüstrobiinil puudub mõju kimalaste suremusele ja toitumisele, aga koosmõjus insektitsiididega sulfoksafloor muutis aga enamike uuritud dooside (5 – 25 µg juures) korral mõju kimalaste suremusele ja toitumisele antagonistlikult. Kuid suurima sulfoksafloori doosi puhul (50 µg) hoopis võimendas mõju. Samuti vähendasid sulfoksafloori kõrgemad doosid kimalaste kaalu, aga madalamad doosid seda ei mõjutanud.</p> <p>Tulenevalt katsest, mõjutavad pestitsiidid kimalaste suremust ja toitumist olenevalt doosidest. Leitud antagonistlikku efekti ei tohiks aga käsitleda kui kimalaste tervist turgutava vahendina, sest kirjanduses on piisavalt näiteid ka asoksüstrobiini kahjulikust mõjust mesilastele. Täpsema selguse saamiseks oleks vaja kasutada täpsemaid käitumuslikke või füsioloogilisi analüüse.</p>			
Märksõnad: sulfoksafloor, asoksüstrobiin, karukimalane, pestitsiidide mõju, suremus, toitumine			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Bachelor's Thesis	
Author: Maribel Rohesalu		Specialty: Horticulture	
Title: Impact of sulfoxaflor and azoxystrobin on bumblebee (<i>Bombus terrestris</i> L.) workers			
Pages: 38	Figures: 5	Tables: 1	Appendixes: 1
Department: Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Chair of Plant Health Field of research: CERCS B390 Supervisors: Margret Jürison MSc, Reet Karise PhD Place and date: Estonian University of Life Sciences, 2021			
<p>People have developed a number of pesticides, which has led to addiction to their use. Neonicotinoids have been partially or completely banned and various pesticides that could replace them have been studied, such as sulfoxaflor. As a result, it is necessary to have an idea of the effects of sulfoxaflor with other pesticides in the field.</p> <p>The aim of this study was to find out the effects of sulfoxaflor and azoxystrobin individually and in combination on the mortality and nutrition of bumble bees, and to determine whether the potential effects of these substances on each other's effects are similar to those of both research subjects.</p> <p>The experiments were performed in the plant protection laboratory of the Estonian University of Life Sciences. Bumble bee workers (<i>Bombus terrestris</i>) were used in the experiment, who were individually treated with different solutions containing the insecticide sulfoxaflor and the fungicide azoxystrobin and mixtures. Acetone was used as a negative control and dimethoate as a positive control.</p> <p>The study showed that azoxystrobin had no effect on bumble bee mortality and nutrition, but in combination with insecticides, sulfoxaflor altered the effect on bumble bee mortality and nutrition antagonistically at most doses tested (5 - 25 µg). However, at the highest dose of sulfoxaflor (50 µg), the effect was amplified. Higher doses of sulfoxaflor also reduced bumblebee weight, but lower doses did not affect it.</p> <p>Based on the experiment, pesticides affect the mortality and nutrition of bumblebees, depending on the dose. However, the antagonistic effect found should not be seen as a health-enhancing tool for bumblebees, as there are sufficient examples of harmful effects of azoxystrobin on bees in the literature. Advanced behavioural or physiological analyses should be used for further clarity.</p>			
Keywords: sulfoxaflor, azoxystrobin, bumble bee, pesticide impact, mortality, food consumption			

SISUKORD

SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Kimalased	8
1.1.1. Karukimalane (<i>Bombus terrestris</i> L.)	9
1.2. Pestitsiidid.....	10
1.2.1. Herbitsiidid	10
1.2.2. Insektisiidid	11
1.2.3. Fungitsiidid.....	12
1.2.4. Pestitsiididest tulenevad ohud	12
1.3. Sulfoksaflor.....	13
1.4. Asoksüstrobiin	14
2. MATERJAL JA METOODIKA	16
2.1. Kimalaste päritolu ja hoidmine enne katset	16
2.2. Katses kasutatud pestitsiidid	17
2.3. Katse käik	18
2.4. Statistiline analüüs	18
3. TULEMUSED.....	19
3.1. Suremus	19
3.2. Kaalumuutus	21
3. ARUTELU JA JÄRELDUSED	23
KOKKUVÕTE	26
SUMMARY	28
KASUTATUD KIRJANDUS	30
LISAD	37
Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks (avaldamise tähtajaline piirang) ning juhendajate kinnitus töö kaitsmisele lubamise kohta	38

SISSEJUHATUS

Inimesed on arendanud tuhandeid pestitsiide toiduainete, kariloomade ja tervise kaitsmiseks. Vaatamata resistentsuse sagedasele arengule on põllumajanduskemikaalide tohutu edu tekitanud lahendamatu sõltuvuse nende kasutamisest (Knight ja Norton, 1989). Samuti väitsid nad, et uute ühendite jätkuv väljatöötamine vanade ebaefektiivsete kemikaalide asendamiseks on asetanud põllumajanduse pestitsiidide jooksulindile. Tendents pestitsiidide suurema kasutamise ja kõrgemate kulude kui põllumajandusliku tootmise sisendite järele jätkub nii resistentsuse hüppelisest suurenemisest hoolimata kui ka selle tõttu (Sealsamas). Siin tuleb esile ka see, et osade kahjurite jaoks on tõhusate pestitsiidide kontakt madal. Kahjurite resistentsusest tulenev pestitsiidide efektiivsuse vähenemine mõjutab oluliselt majandust, keskkonda ja inimeste tervist (Damalas, Eleftherohorinos, 2011).

Kuna neonikotinoidid on osaliselt keelustatud, siis üks võimalus nende asendamiseks on kasutusele võtta sulfoksafloor, mis on samuti süsteemne insektitsiid. Sulfoksafloor on sulfoksimiine sisaldav insektitsiid, mis on efektiivne paljude taimemahladest toituvatele putukatele kaasaarvatud nendele, kes on resistentsed neonikotinoidide vastu. Seda kasutatakse mitmes Euroopa Liidu liikmesriigis, aga Eestis on kasutusluba praegu puudu. Tootja poolt on tehtud katsed, mis näitavad, et see mõjutab nikotiin-atsetüülkoliini retseptorite vastuvõttu putukatel, aga on suhteliselt ohutu mesilastele (Bacci jt, 2018). On tuvastatud mõningane pikaajaline mõju kimalaste perede arengule ja võib esineda pärast pritsimist taimede nektaris ja õietolmus (Siviter jt, 2018). Sulfoksafloori mõjust tolmeldajatele on uuritud ja on leitud, et see tõstab mesilaste suremust siis, kui on insektitsiidiga pikalt kontaktis olnud just põldudel kasutatud doosidega (Boff jt, 2021). Samas mesilaste kaalule või tolmeldamisele ei ole leitud suuri mõjutusi nii kokkupuutel sulfoksaflooriga või kokkupuutejärgselt (Tamburini jt, 2021). Kuid omakorda on leitud, et kontakt insektitsiidiga mõjutab kimalaste munemist ning hoopis vähendab toitumist (Siviter jt, 2019).

Asoksüstrobiin on fungitsiid, mis on laia toimespektriga, aktiivne kõigi seenpatogeenide taksonoomiliste rühmade vastu. Seda kasutatakse sageli ja see oli 1999. aastal maailma enimmüüdud fungitsiid. Asoksüstrobiin pärsib mitokondrite hingamist ja on mesilastele mõõdukalt ohtlik blokeerides elektronide transporti (Joseph, 1999). Asoksüstrobiini äge toksilisus on suurem kui 200 µg mesilase kohta, kuid selle olulise fungitsiidi kroonilise toime kohta putukatel on teada väga vähe (Christen jt. 2019). Asoksüstrobiini on uuritud koosmõjus insektitsiidiga lindaan, kus üksikute ainete korral ei tekkinud akuutset mürgistust kuid segus tõusis suremus (Dawoud jt, 2017). Samuti on katsetatud ka insektitsiidiga imidaklopriid, kus insektitsiid oli *C. dilutus* jaoks toksilisem, kui asoksüstrobiin (Wei jt, 2021) ja kahe aine puhul koos ilmnis sünergeetiline toime.

Isegi, kui insektitsiidid on putukaid enim mõjutavad vahendid, tuleb selgitada ka nende mõjusid koos teiste samaaegselt esinevate ainetega. Fungitsiididega kokkupuutumisel võib suurened a tundlikkus teiste pestitsiidide, peamiselt insektitsiidide suhtes. Iversoni (2019) uuringus võrreldi insektitsiidi ja fungitsiidi koosmõju suukaudselt kolmel mesilasliigil (*A. mellifera*, *B. terrestris* ja *Osmia bicornis*), kus tulemuseks klotianidiini toksilisus osutus väikseks, aga aja jooksul suurenes, kui seda kombineeriti propikonasooliga. Kimalased osutusid selles katses palju tundlikumaks kui meemesilased ja *O. bicornis* isegi kolmekordselt. Sarnases uuringus uuriti insektitsiidide (tiametoksaam ja bifentriin) ja fungitsiidide (difenkonaool, myclobutanil ja fenheksamiid) kontaktset mürgistust, kus LD₂₀ väärtuste ja maksimaalse suremuse tase tekitas sünergistlikku toksilisust *B. impatiens* töölistele (Iverson jt, 2019). Samasugusele tulemusele on jõudnud ka Raimets jt. (2018). Sulfoksafloori koosmõjus fungitsiidiga fluksapüroksoad tehti samuti *A. mellifera*, *B. terrestris* ja *Osmia bicornis* peal, kus sulfoksafloor ja fluksapüroksoad suurendasid suremust ja LD₅₀ väärtus oli madalam, kui sulfoksafloor üksi (Azpiazu jt, 2021). Pestitsiididega on enamik katseid läbitehtud meemesilastega ja teistele mesilasliikidele on väga vähe tähelepanu pööratud. Samas on teised mesilasliigid tolmeldajatena väga olulised ja nende kaitsmisele pööratakse järjest enam tähelepanu.

Isegi, kui uuringuid on tehtud rohkem suremuse kohta, ei saa väita, et see on ainus mõjutav aspekt. Subletaalselt mõjutavad pestitsiidid veel mitmeid osi putukate käitumises, kaasa arvatud toitumist. Tulenevalt sellest on käesoleva uuringu eesmärgiks uurida sulfoksafloori ja

asoksüstrobiini mõju ja koosmõju kimalaste suremusele ja toitumisele ning teha kindlaks, kas nende ainete võimalik mõju üksteise toimele on mõlema uurimisküsimuse suhtes samasugune.

Lähtuvalt eesmärgist, on püstitatud järgnevad hüpoteesid:

- Asoksüstrobiin suurendab sulfoksafloori mõju ja kimalaste suremus suureneb.
- Sulfoksafloor närvimürgina vähendab kimalaste toitumist ning asoksüstrobiin seda mõju ei muuda.

Soovin avaldada tänu oma juhendajatele Margret Jürisonile ning Reet Karisele abistamise ja toetamise eest nii katsete läbiviimisel, kui ka lõputöö kirjutamisel. Samuti oma perele, kes usuvad ja toetavad mind. Uurimustöö on läbiviidud Euroopa Regionaalarengu Fond koos Eesti Teadusagentuuriga (ETAg) RITA projekti ning Horizon 2020 PoshBee projekti raames.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Kimalased

Kimalased (*Bombus spp.*) on mesilased, kes on kohastunud elama peamiselt jahedas kliimas. Sellest tuleneb ka nende tihe karvkate, suur soojuseproduktsoonivõime ja aktiivne tegutsemine mõnikord isegi nullilähedasel temperatuuril (Halifman, 1978). Kimalasi on maailmas kokku umbes 250 liiki (Comeont jt, 2013), enamik Euraasia ja Põhja-Ameerika mõõduka kliimaga aladelt. Kesk- ja Põhja-Euroopa maades on registreeritud 25-30 liiki (Halifman, 1978.), Eestis elab 21 päriskimalase liiki (Viik jt, 2017).

Kimalased külastavad ja tolmeldavad paljude taimede õisi (Halifman, 1978). Sama autor on rääkinud, et majanduslikult hinnatavaim on kimalaste osa kahe olulisema söödakultuuri – punase ristiku ja lutserni tolmeldamisel. Nad tolmeldavad ka mitmeid looduslikke taimi mida meemesilased ei tolmelda. Kimalaspere koosneb emast ja töökimalastest, sügissuvel, enne pere lagunemist lisanduvad noored isa- ja emakimalased. Ema erineb töölistest ainult suurematelt mõõtmetelt ja arenenumate munasarjade poolest. Töökimalaste vahevorme esineb sageli. Suuremad ja tugevamad soovivad tihti peale võtta võimust ja muneda. Põhjus, miks nad ei saa olla emakimalased, on see, et nad morfoloogiliselt ei ole suutelised paarituma ja seega munevad ainult viljastamata mune ning nendest arenevad ainult isased kimalased (Cnaani jt, 2002). Kimalased on paljude põllukultuuride ja looduslike lillede olulised tolmeldajad. Nad tegutsevad eri aegadel ja eri taimeliikidel ning neil on seetõttu tõenäoliselt erinevad kokkupuuted pestitsiididega. Erinevalt meemesilastest ei teata tõenäoliselt pestitsiididest tingitud kimalaste surmadest, kuna kimalasi ei hoita ega peeta inimeste rajatud tarudes, kus märgataks nende kadumist. Samuti surevad nad väiksema arvulisemalt (Thompson ja Hunt, 1999).

Töökimalased on mitmesuguse suurusega, suuremad käivad peamiselt korjel, väiksemad töötavad valdava osa ajast pesas. Mõne liigi kõige väiksemad töölised ei lenda üldse ja veedavad terve oma elu pesas (Halifman, 1978).

1.1.1. Karukimalane (*Bombus terrestris* L.)

Karukimalane (*Bombus terrestris* L.) on keskmise arvukuse liik. Välimuselt on ta must, rindmiku eesosa ja tagakeha teine lüli kollased ning tagakeha tipp valge. Karukimalasi on võimalik segi ajada maakimalasega, kuid Eestis on maakimalasel rindmiku triip võrreldes karukimalasega tavaliselt laiem ja tumedam (Viik, Mänd, 2012). Suised on karukimalastel lühema või keskmise pikkusega, kuid suurematel isenditel võivad need ka keskmisest pikemad olla (Halifman, 1978).



Joonis 1. Karukimalane (*Bombus terrestris* L.) (Buhl, 2010)

Karukimalased pesitsevad maa all kuni 2 meetri pikkustes tunnelites ja pesitsevad inimeste läheduses. Kimalased eelistavad avatuid elupaiku (põllud), aga metsi väldivad, kuna metsades kasvab vähem neile sobilikke toidutaimi. Peale talvitumist, väljuvad nad pesast varakevadel, peale niidu- ja maakimalast. Karukimalastel on suured pered, kus võib olla kuni 400 isendit (Bumblebee Nests, 2021) ja suudavad ennast rohkem kaitsta kui teised liigid ning nende eluiga on pikk (Halifman, 1978). Karukimalaste elamispaikadest väljapool asuvatel aladel on vähe

või isegi puudub vaenlasi populatsiooni kasvu kontrollimiseks (Buttermore, 1997; Hingston ja McQuillan, 1998; Goka, 2010).

Tänu suurele perele ja nende heale kohanemisvõimele kasutatakse karukimalasi ka kasvandustes. Peresid toodetakse tehistingimustes ja viiakse kasvuhoonetesse tomateid ja teisi taimi tolmeldama. Need kimalased sobivad oma heade omaduste tõttu laboris kasvatamiseks ning taluvad ka tööstustingimustes tolmeldamiseks tootmise tingimusi. Võime oletada, et uurides üht liiki saame teha järeldusi ka teiste kimalasliikide kohta. Ning tänu nendele tööstuslikult toodetud kimalastele ei pea teaduskatseteks kasutama loodusest püütud kimalasi.

1.2. Pestitsiidid

Pestitsiidid on ained, mida kasutatakse kahjurloomade, umbrohtude ja taimehaiguste tõrjeks. Nende ülesandeks on tõrjuda kahjurit või haigust, sealhulgas kaitstes taimi või taimseid saaduseid tootmise, ladustamise või transpordi käigus (Maaeluministeerium, 2021). Taimekasvatases kasutatavate pestitsiidide hulka kuuluvad herbitsiidid, on mõeldud umbrohtude ja muu soovimatu taimestiku hävitamiseks, insektitsiididega tõrjutakse putukaid ning fungitsiide kasutatakse seenhaiguste tõrjeks. Pestitsiidid hõlmavad lisaks taimekaitsevahenditele ka biotsiide, mida kasutatakse ladude ja transpordivahendite desinfitseerimiseks, elumajadest putukate tõrjumiseks vm.

1.2.1. Herbitsiidid

Herbitsiidid on keeruka struktuuriga kemikaalid, mis hävitavad taimi mitmel erineval viisil. Oma tõhususe saavutamiseks, peab herbitsiid puutuma kokku taimega, imenduma või liikuma taimes toimimiskohta, mida tahetakse hävitada (Das ja Mondal, 2014). Herbitsiidid jagunevad

toimeviisilt valikulise toimega ja üldhävitava toimega taimekaitsevahendiks (Dayan jt, 2019). Valikulise toimega herbitsiidid hävitavad spetsiifilisi taimi, jättes soovitud saagi vigastamata. Mõned valikulise toimega herbitsiididest võivad aga kultuurtaime kasvu häirida. Herbitsiidid, mida kasutatakse jäätmaade, tööstusterritooriumite, raudteede ja raudteetammide puhastamiseks, ei ole valikulised, vaid hävitavad kogu taimse materjali, millega nad kokku puutuvad (Das, Mondal, 2014). Herbitsiidide ebaõige kasutamise korral võivad kahjustuda põllukultuurid, keskkond ning herbitsiidi pealekandja ja teised, kes kemikaaliga kokku puutuvad.

1.2.2. Insektisiidid

Insektisiidid on kemikaalid, mida kasutatakse putukate tõrjeks ning need jagunevad nende struktuuri ja toimeviisi järgi (Aktar jt, 2009). Autorite sõnul paljud insektisiidid mõjutavad putukate närvisüsteemi (nt pärsivad koliinesteraasi teket või toimimist), teised aga mõjutavad putukate kasvuhormoone või sisaldavad bakterite endotoksiine. Insektitsiide kasutatakse tavaliselt põllumajanduses, rahvatervises ja tööstustes, samuti kodumajapidamistes ja kaubanduses (näiteks prussakate ja termiidide tõrjeks).

Insektitsiide kasutatakse erinevates vormides ja manustamissüsteemides – pihustina, peibutussöödana, aeglaselt vabaneva difusioonina. Samuti võttes võrdlusesse kontaktse ja süsteemse toime, kus kontaktne toime ei liigu taimse sisse, sealhulgas seemnetesse, lehtedesse ja ei jäta jääke. Süsteemne toime võib jätta jäägid saaki ja koristusjääkidesse. Nii süsteemsed kui kontaktseid insektitsiidid võivad sattuda tolmeldajate organismi (Aktar jt, 2009).

1.2.3. Fungitsiidid

Fungitsiidid on ained, mis hävitavad seeni, tõrjuvad või ennetavad nende arengut (Bolognesi ja Merlo, 2019). Peamiselt on fungitsiidid bioloogilist või keemilist päritolu ning jagunevad kaheks: ennetavad ja kaitsvad (Doble ja Kumar, 2005). Ennetavad fungitsiidid on ained, mis takistavad seenhaiguste esinemist taimes. Nende hulka kuuluvad sellised ühendid nagu väävel, diklorokarbamiidid, metallorgaanilised ühendid, ftalimiidid ja bensimiidid. Kaitsvateks fungitsiidideks nimetatakse aineid, mis liiguvad infektsiooni tekkimise kohta ja takistavad seal patogeeni edasist arengut. Nende hulka kuuluvad sellised ühendid nagu atseetamiid, dikarboksimiidid ja paljud teised. Atseetamiid on orgaaniline ühend, mis on kõige lihtsam äädikahappest saadud amiid. Dikarbosiimiidid on endokriinide häirijad, mis on näidanud antiandrogeenset toimet ehk meessuguhormoonide taseme langust (Wheeler ja Johnston, 2013).

1.2.4. Pestitsiididest tulenevad ohud

Toidu tootmisel ja tervise kaitsmisel kasutatakse maailmas üle 800 erineva pestitsiidi, mida maksimaalse efektiivsuse saavutamiseks kasutatakse sageli kombineeritult (Casida, 2017). Pestitsiide peetakse sageli kiireks, lihtsaks ja odavaks lahenduseks umbrohtude ja kahjurite tõrjumiseks põllumajanduses kui ka linnamaastikul (Aktor jt, 2009). Pestitsiidide kasutamisega kaasnevad aga märkimisväärsed ohud. Pestitsiididega saastumine kujutab endast olulist ohtu keskkonnale ja organismidele, mis ei ole sihtorganismid, ulatudes kasulikest pinnase mikroorganismidest kuni putukate, taimede, kalade ja lindudeni. Vastupidiselt levinud väärarusaamadele võivad isegi herbitsiidid kahjustada keskkonda.

Nende hulgas keelati või piirati pärast 1960. aastaid enamikus tehnoloogiliselt arenenud riikides kloororgaanilisepestitsiide, mida edukalt kasutati paljude haiguste, näiteks malaaria ja tüüfuse tõrjeks. Muude sünteetiliste pestitsiidide - fosfororgaaniliste pestitsiidide kasutuselevõtt 1960. aastatel, karbamaadid 1970. aastatel ja püretroidid 1980. aastatel ning

herbitsiidide ja fungitsiidide kasutuselevõtt 1970. – 1980. aastatel aitasid kahjuritõrjele ja põllumajandustoodangule suuresti kaasa (Aktar jt, 2009).

Pestitsiididest on väga põhjalikult uuritud neonikotinoidsete insektitsiidide mõju tolmeldajatele (Woodcock jt, 2016). Fungitsiide peetakse sageli kimalastele suhteliselt mittetoksilisteks ja kahjulikku mõju kimalastele on seni leitud peamiselt EBI fungitsiidide puhul, mis ise otseselt ei ohusta, kuid võivad vähendada teiste kemikaalide detoksifikatsiooni ja suurendada nende toksilisust tohutult (Goulson jt, 2015; McArt jt, 2017a; Sgolastra jt, 2016; Raimets, 2018). Osades katses tehti kindlaks, et ka mitte-EBI fungitsiidid üksi (Artz, Pitts-Singer, 2015; Bernauer jt, 2015; Ladurner jt, 2005) või koostoimes teiste pestitsiididega (De Grandi-Hoffman jt, 2013) võivad mesilastele negatiivset mõju avaldada. Isegi meemesilaste perede hukkumisi ja häireid on seostatud fungitsiidi olemasoluga (Simon-Delso jt, 2014). Informatsiooni levinud fungitsiidide võimaliku mõju kohta kimalastele on siiski vähe.

Pestitsiide kasutatakse varakevadel või sügisel tavaliselt põllumajanduslikes tootmissüsteemides ja muudel põllumajandusmaastikel, millega toimetatakse samal ajal, kui paljud õitsvad taimed, kes sõltuvad kimalaste tolmeldamisest. Seetõttu võivad kimalased nende pestitsiididega kokku puutuda käies korjel maastikul, kus taimekaitsetöid on tehtud. Neid pestitsiididega kokkupuutumise stsenaariume simuleerivad laboratoorsed ja tunnelkatsed on näidanud surmavat ja subletaalset mõju nii meemesilastele kui ka teistele mesilaselaadsetele. Herbitsiidid võivad kaudselt mõjutada mesilasi umbrohu ja muude õistaimede vähenemise tõttu, mis toimivad mesilaste toitmiseks toitaineressurssidena (Belsky jt, 2020).

1.3. Sulfoksaflor

Sulfoksimiidid, nagu näiteks sulfoksaflor, esindavad uut tüüpi insektitsiide. Sulfoksaflor on putukate nikotiinsete atsetüülkoliiniretseptorite (nAChR) agonist ehk ühend, mis võib seonduda retseptoriga ja põhjustada selle aktiveerimist. Sulfoksaflor toimib teistest nAChR-

del toimivatest insektitsiididest erinevalt. Sulfoksimiinidel on ka struktuuri aktiivsuse seosed, mis erinevad teistest nAChR agonistidest, näiteks neonikotinoididest (Sparks jt, 2013). Nende faktide põhjal on paigutatud sulfoksafloori neonikotinoididest eraldatud toimeviisi alarühma (Culter jt, 2013). Seega pakub sulfoksafloor kasvatajatele uusi võimalusi kahjurputukate tõrjeks. Sulfoksafloor on juba registreeritud paljude kultuuride jaoks, näiteks nisu, rapsi või tomati jaoks kõigil asustatud mandritel.

Sulfoksafloori on katsetatud mitmetel mesilasliikidel ning on leitud, et erakmesilane *O. bicornis* oli kõige tundlikum liik, kus toksilisuse tulemus oli väljendatud kõige negatiivsemalt suremuses ja kaalumuutuses. Kõige vastupidavam oli karukimalane (*Bombus terrestris*) (Azpiazu jt, 2021). Mõned uuringud on näidanud, et põllul kasutatavad doosid mõjutavad mesilaste paljunemisvõimet negatiivselt, kuid mitte toitumist ja kognitiivset käitumist (Siviter jt, 2018). Meemesilastega läbi viidud tunnelaktses näidati, et kokkupuutefaasis on suremus suurenenud, kuid pere tasandil üldine mõju puudub (Cheng jt, 2018).

1.4. Asoksüstrobiin

Asoksüstrobiin on süsteemne laia toimespektriga fungitsiid, mida kasutatakse laialdaselt põllumajanduses (Bartlett jt, 2002), see toimib kõigi seenpatogeenide taksonoomiliste rühmade vastu (Joseph, 1999). Asoksüstrobiin toimib seente mitokondrite hingamist pärssivalt, blokeerides elektronide transpordiahela sisemises mitokondriaal membraanis (Becker jt, 1981).

Asoksüstrobiini omapäraks on looduslikult esinevate strobiluriinide sünteetiline analoog ning sellega suudab tagada pikaajalise vastupanu paljude haiguste vastu. See toimeaine liigub läbi lehepinna lehe alumisele küljele, peatades haiguse enne kahju teket. Samuti selle omaduseks on rohendav mõju, mis pikendab lehtede rohelus aega ja seega suurendab saaki. Asoksüstrobiini pritsitakse enne pärislehefaasist kuni enne õitsemise faasi (olenevalt kultuurist). Preparaati kasutatakse tuulevaikse ilmaga, et vältida selle kandumist naabruses

asuvatele kultuuridele (Syngenta, 2021). Nagu enamik pestitsiide, mis on lenduva iseloomuga, võib asoksüstrobiini kasutamine seenhaiguste tõrjel põhjustada tõsist veekeskkonna reostust, jäädes pärast õhupihustamist või kaudselt, äravoolu ja / või leostumisprotsesside abil (Rodrigues jt, 2013).

Tavaliselt leidub asoksüstrobiini mesilastes ja mesilaste kogutud materjalides (Long, Krupke, 2016; Mullin jt, 2010). On mõningaid tõendeid selle kohta, et asoksüstrobiin võib toitumise kaudu suurendada meemesilaste suremust (Fisher jt, 2017) ja mõjutada hormonaalset süsteemi reguleerivate geenide ekspressiooni või ainevahetust (Christen jt, 2019). Kuid need mõjud kas ei suurenenud annuse suurenedes või täheldati neid ainult kontsentratsioonides, mis ületasid realistliku taseme. Lisaks on ebaselge, kas sellised mõjud ulatuvad pere tasemeni (Tamburini jt, 2021). Asoksüstrobiini on uuritud koosmõjus insektitsiidiga lindaan, kus see ei tekitanud akuutset mürgistust *A. aquaticus* peal ja koos asoksüstrobiiniga tõusis suremus (Dawoud jt, 2017). Samuti on asoksüstrobiini katsetatud ka imidaklopriidiga *Chironomus dilutus* peal, kus leiti, et insektitsiid oli palju toksilisem, kui asoksüstrobiin, mille LD₅₀ oli ühe suurusjärgu võrra väiksem (Wei jt, 2021).

2. MATERJAL JA METOODIKA

Kimalaste akuutne kontaktkatse pestitsiididega sulfoksafloor ja asoksüstrobiin, viidi läbi 2020. aasta oktoobris, Eesti Maaülikooli Taimetervise õppetooli putukate füsioloogia laboris. Katse käigus jälgiti sulfoksafloori ja asoksüstrobiini mõju ja koosmõju karukimalase (*B. terrestris*) töölistele. Metoodika välja töötamisel kasutati OECD 2017. aasta juhendit (OEC, 2017).

2.1. Kimalaste päritolu ja hoidmine enne katset

Katsetes kasutatud karukimalased (*B. terrestris*) telliti ettevõttest BioBest (Westerlo, Belgia). Katses kasutatud 600 töölist valiti juhuslikult 8 erineva pere hulgast, pandi Nicot® puuridesse (148 x 130 x 11 mm, Cell protector cage type NICOT, NICOTPLAST SAS - 75, Rue des Cyclamens - 39260 MAISOD – France) ning kimalased kaaluti koos puuridega (Joonis 2).



Joonis 2. Puurides kimalaste kaalumine ja söötmine (Autori joonis).

Töötlusgrupidesse jaotati kimalased kaalu järgi võrdselt, igas grupis oli 40 isendit. Kimalasi aklimatiseeriti 24h jooksul katsetingimustes kontrollitud keskkonnas ($25 \pm 1^\circ \text{C}$, $\sim 60\%$ suhteline õhuniiskus ja pimedus) ning neil oli vaba juurdepääs söödasiirupile.

2.2. Katses kasutatud pestitsiidid

Katses kasutati insektitsiidi sulfoksafloor (Chem service inc., 99,7% puhas toimeaine) ja fungitsiidi asoksüstrobiin (Honeywell Fluka, 98%, puhas toimeaine), positiivse kontrollina dimetooati (Honeywell Fluka, 99,9% puhas toimeaine) ning negatiivse kontrollina puhast atsetooni, mis oli segatud 0,1% Triton X-iga. Atsetooni oli vaja kontrollina kasutada sellepärast, et sulfoksafloor ja asoksüstrobiin segati atsetoonis. Triton X on vajalik, et tagada tilga homogeenne jaotumine kimalase rindmikule.

Enne lahjendusi segati kokku põhilahus. Põhilahus on kontsentreeritud lahus, mis lahjendatakse tegelikuks kasutamiseks madalama kontsentratsioonini. Sulfoksafloori põhilahuse jaoks lahustati 10mg pulbrikujul puhast sulfoksafloori 2µl atsetooniga. Asoksüstrobiini põhilahuse jaoks lahustati 100mg pulbrikujul puhast asoksüstrobiini 2ml atsetooniga ning positiivse kontrolli dimetooadi põhilahuse jaoks lahustati samuti 100mg pulbrikujul puhast dimetooati 2ml atsetooniga. Kõiki põhilahuseid kasutati edasiste lahjenduste tegemiseks. Katses valitud doosid saadi eelnevate katsete põhjal ja on esitatud tabelis 1. Kasutusele võeti kõikides katsevariantides 8 kimalaspere kimalast, kus igas katsevariandis oli 40 isendit. Sulfoksafloori doosideks valiti 50, 25, 10, 5, 1 ja 0,1 µg kimalase kohta. Asoksüstrobiini doosiks 100 µg kimalase kohta, mis on suurim doos, mille juures kimalastel kõrgenenud suremust ei esine (vastavalt eelkatsete tulemustele) ning dimetooadi doosiks 5 µg kimalase kohta, mis on EFSA soovitatud kontrolldoos.

2.3. Katse käik

Katsed viidi läbi punase LED-valguse all, kuna kimalased ei näe valguse punast spektriosa (Comont 2017), ei saa nad punase valguse käes efektiivselt rünnata ning nendega on lihtsam töötada. Töötlused koosnesid (1) negatiivsest kontrollist, (2) positiivsest kontrollist (dimetoot), (3) erinevatest sulfoksafloori lahjendustest, (4) ühest asoksüstrobiini lahjendusest, (5) asoksüstrobiini segu erinevate sulfoksafloori lahjendustega. Lõpplahustele lisati 0,1% (5%) Triton X. Töölistele annustati rindmikule 2 µl lahust. Töödeldud kimalased paigutati katsekambrisse ülalnimetatud tingimustesse. Suremuse andmed registreeriti 6, 24, 48, 72 ja 96 tundi pärast töötlust pestitsiididega. Kimalased peeti surnuks, kui nad ei liigutanud oma jalgu ega tundlaid ega reageerinud puudutustele.

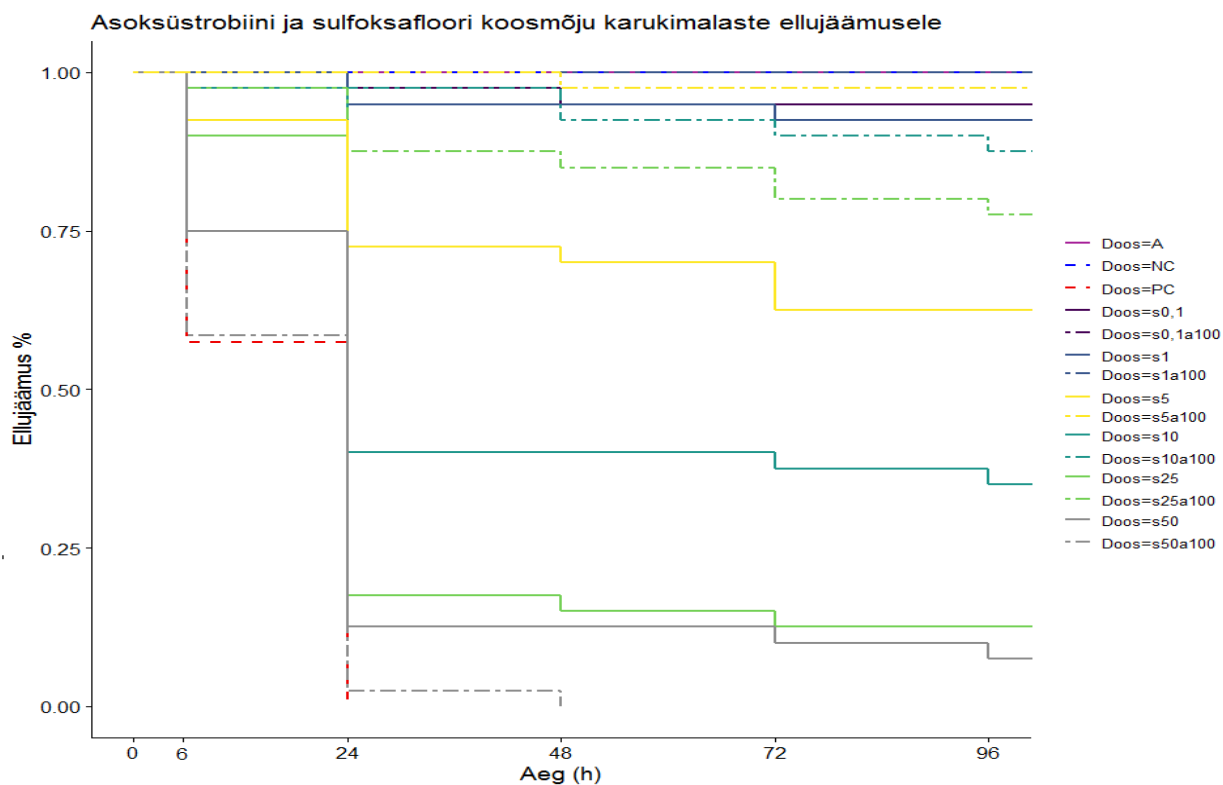
2.4. Statistiline analüüs

LD₅₀ väärtused ja nende vastavad 95% usaldusintervalli väärtused määrati logistilise regressiooni abil. Ellujäämise protsendi leidmisel ja esitamisel kasutati Kaplan-Meieri meetodit. Sulfoksafloori ja asoksüstrobiini mõju uurimisel kimalaste kaalu muutusele kasutati Wilcoxon'i paarikaupa võrdluste testi. Statistilised testid viidi läbi statistikaprogrammi RStudio versiooniga 1.3.1093 R versiooniga 3.6.2 (R Core Team, 2019). Kõik testid loeti statistiliselt oluliseks, kui p väärtus oli <0,05.

3. TULEMUSED

3.1. Suremus

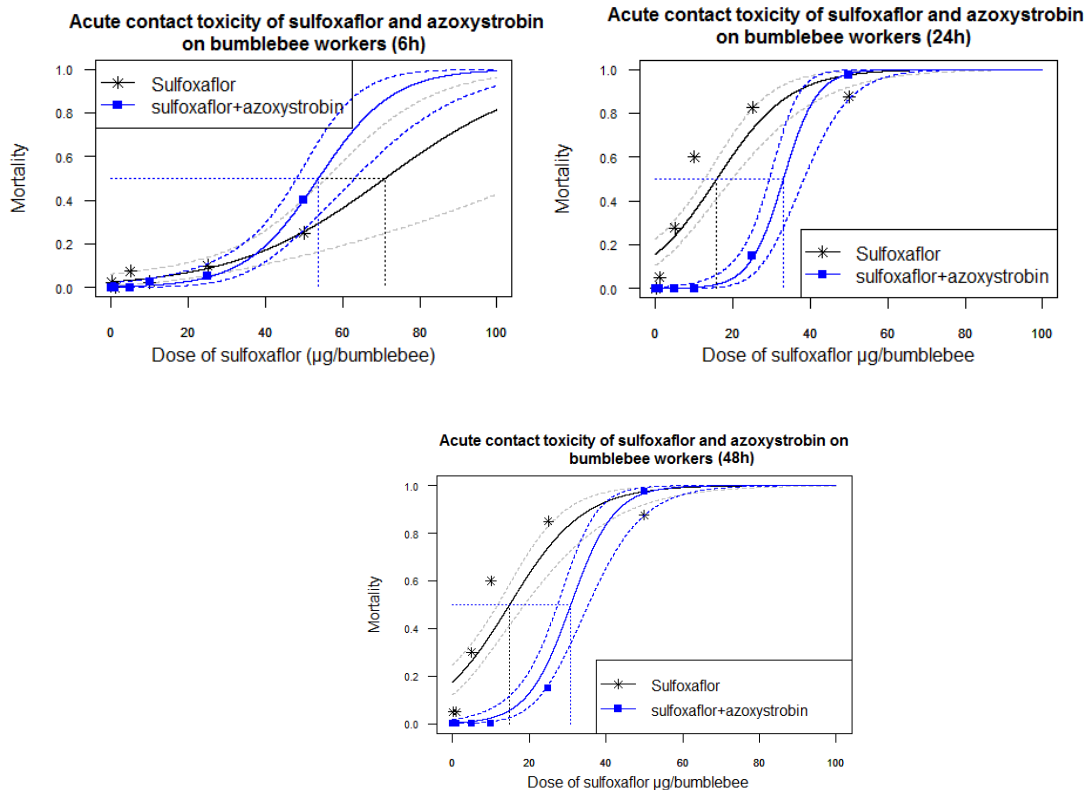
Antud uuringust selgus, et kontroll atsetooniga ning asoksüstrobiin ei suurendanud kimalaste töölistel suremust (Joonis 3). Sulfoksaflori doosidega 0,1 ja 1 µg/kimalase kohta oli peale 24 tundi ellujäämine 95-100%, doosiga 5 µg/kimalase kohta 75%, doosiga 10 µg/kimalase kohta 40% ning 25 ja 50 µg/kimalase kohta oli see alla 25%. Positiivse kontrollina dimetooat aga suurendas kimalaste suremust 100% 24 tunni jooksul.



Joonis 3. Sulfoksaflori ja asoksüstrobiini mõju ellujäämisele 6, 24, 48, 72 ja 96 tunni jooksul. Pidevate joontega on tähistatud sulfoksaflori ja asoksüstrobiini mõju, punktjoontega

on tähistatud sulfoxaflori ja asoksüstrobiini koosmõju, katkendliku joontega on tähistatud negatiivne kontroll (NC) ja positiivne kontroll (PC). s=sulfoksafloor, a=asoksüstrobiin, A-asoksüstrobiin.

Kuue tunni jooksul pärast kokkupuudet osutusid asoksüstrobiini ja sulfoksafloori doosid segus sama toksiliseks kui puhas sulfoksafloor (joonis 4). 24 tunni jooksul tulemus pöördus ning segud oli vähem toksilised kui sulfoksafloor üksi, välja arvatud kõige madalama ja kõige kõrgema doosi puhul. Asoksüstrobiini ja sulfoksafloori koosmõjul tekib antagonistlik efekt, mis saabub 24 tundi peale töötlust ja ei kao ka 48 tunni jooksul (joonis 4). Arvutuslikud LD₅₀ väärtused 6 tunni jooksul olid sulfoksaflooril üksi 71 µg kimalase kohta (95% usalduspiirid 60 82) ning segul 53,1 µg kimalase kohta (95% usalduspiirid 50,1 56,1). 24 tunni jooksul olid LD₅₀ väärtused sulfoksaflooril üksi 15,8 µg kimalase kohta (95% usalduspiirid 14,1 17,5) ning segul 33,6 µg kimalase kohta (95% usalduspiirid 31,5 35,7). 48 tunni jooksul olid LD₅₀ väärtused sulfoksaflooril üksi 14,9 µg kimalase kohta, (95% usalduspiirid 13,2 16,6), segul 31,2 µg kimalase kohta (95% usalduspiirid 29,3 33,3).



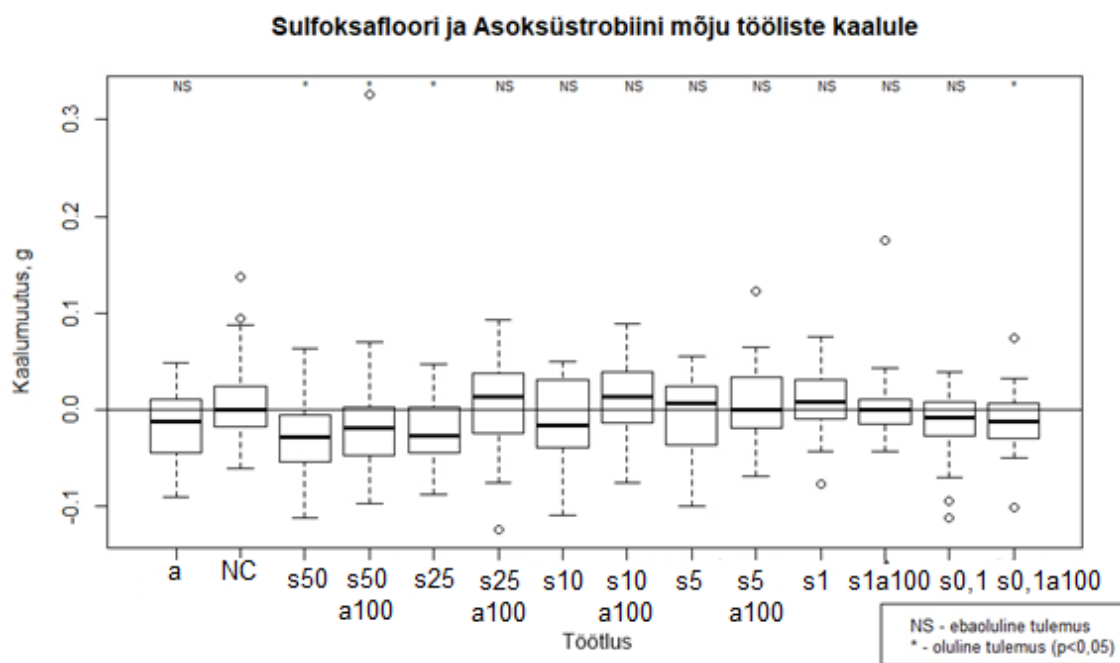
Joonis 4. Logistilise regressiooni mudeli kõverad ($\pm 95\%$ usaldusintervall) sõltuvalt kasutatud sulfoksaflori doosidest vastavalt kas puhta aina või segus askosüstrobiiniga (100 μg kimalase kohta). Vertikaalsed/horisontaalsed punktiirjooned näitavad 50% suremuse (LD_{50}) arvutuslikku väärtust.

3.2. Kaalumuutus

Kruskal-Wallise testi järgi sõltub tööliste kaalumuutus tööstlusest (Kruskal-Wallise test, Hii-ruut = 23.098, $\text{df} = 6$, $p\text{-value} = 0.001$ (joonis 5).

Erinevate tööstluste paarikaupa võrdluses kaalumuutuse suhtes leiti, et asoksüstrobiin üksi toitumist ei mõjutanud. Sulfoksaflor ise vähendas toitumist kõrgete dooside (25 $\mu\text{g}/\text{kimalane}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kimalane}$) ja kõige madalama (0,1 $\mu\text{g}/\text{kimalane}$) doosi puhul. Kaalu muutuses on näha antagonistlikku efekti just segus sulfoksaflori doosis 50 $\mu\text{g}/\text{kimalane}$ ja

asoksüstrobiini doosis 100 µg/kimalane samuti sulfoksafloor doosis 25 µg/kimalane ja asoksüstrobiini doosis 100 µg/kimalane ning sulfoksafloor doosis 10 µg/kimalane ja asoksüstrobiini doosis 100 µg/kimalase kohta, kus pestitsiidide koostoimel toitumine ei vähene nii palju, kui sulfoksaflooriga üksi.



Joonis 5. Sulfoksafloori ja asoksüstrobiini mõju tööliste kaalule. Ruudud näitavad 25 % ja 75 % kvartiile kaalumuutuse puhul, joon ruudus näitab mediaani. Horisontaalsed kriipsud näitavad üldkogumit ja üksikud ringid ekstreemseid väärtusi, mis jäävad vaadeldavast üldkogumist välja. Statistiliselt olulised tulemused on tähistatud tärniga (*), statistiliselt mitteolulised tulemused lühendiga NS (not significant). a – asoksüstrobiin; NC- negatiivne kontroll; s50 – sulfoksafloor 50 µg/kimalane; s50a100 – sulfoksafloor 50 µg/kimalane ja asoksüstrobiin 100 µg/kimalane; s25 – sulfoksafloor 25 µg/kimalane; s25a100 – sulfoksafloor 25 µg/kimalane ja 100 µg/kimalane; s10 – sulfoksafloor 10 µg/kimalane; s10a100 – sulfoksafloor 10 µg/kimalane ja 100 µg/kimalane; s5 – sulfoksafloor 5 µg/kimalane; s5a100 – sulfoksafloor 5 µg ja asoksüstrobiin 100 µg/kimalane; s1 – sulfoksafloor 1 µg/kimalane; s1a100 – sulfoksafloor 1 µg/kimalane ja asoksüstrobiin 100 µg/kimalane; s0,1 – sulfoksafloor 0,1 µg/kimalane; s0,1a100 – sulfoksafloor 0,1 µg/kimalane ja asoksüstrobiin 100 µg/kimalane.

3. ARUTELU JA JÄRELDUSED

Käesolev uurimustöö näitas, et asoksüstrobiinil on sulfoksafloorile antagonistlik mõju. Seda näitavad nii suremuse kui toitumise muutuse analüüs. Asoksüstrobiin vähendab sulfoksafloori mõju nii suremusele kui toitumisele. Samas kõrgeima kasutatud doosiga ilmnes mõju võimendav efekt.

Sulfoksaflooriga on mõningaid uuringuid kimalastel tehtud. Näiteks Liiskmanni (2020) tehtud uurimustöös osutus sulfoksafloor karukimalastele samuti toksiliseks, kus sulfoksafloori toimeaine saavutas 100% suremuse ainult doos 50 µg kimalase kohta ehk 24 h möödudes olid kõik karukimalase töölistel surnud. Samuti Liiskmanni (2020) antud tulemustes vähendas sulfoksafloori toimeaine kimalaste toitumist doosidega 5, 12, 20 ja 50 µg kimalase kohta. Madalamad doosid (0,06 ja 1,6 µg/kimalane) ei mõjutanud suremust ja toitumist. Praeguses töös aga sulfoksafloori doos 50 µg kimalase kohta ei saavutatud 100% suremust 24 tunni jooksul, aga doos koos sulfoksafloori ja asoksüstrobiiniga tekitas 100% suremuse. Toitumise muutus oli siinses katses sarnane.

Antud uuringu tulemus, lühikese aja jooksul koosmõju efekt ei ilmnenu, näitab seda, et asoksüstrobiiniga kaasneva toime avaldumiseks on vaja pikemat aega. Aja jooksul see fungitsiid vähendab insektsitsiidi toimet. Asoksüstrobiin ise ei põhjustanud kimalaste töölistel suremust, aga muutis enamike uuritud dooside korral sulfoksafloori mõju antagonistlikult (5 – 25 µg juures). Kuid suurima doosi puhul (50 µg) hoopis võimendas mõju. Järgnevalt ka kaalum muutustes on sama efekt, kus asoksüstrobiin ei mõjuta kaalum muutust, aga muudab just sulfoksafloori kõrgemaid doose, vähendades toitumist ja madalamate dooside puhul ei mõjutanud toitumist.

Teiste autorite poolt on samuti leitud antagonistlikke efekte asoksüstrobiini ja teiste pestitsiididega. Ühes uuringus kontrolliti fungitsiidide flukinkonasooli ja asoksüstrobiini mõju

ja koosmõju, kus haiguse kontrolli efekt paranes flukinkonasooli väikeste annuste korral, samas suurtes annustes oli flukinkonasool parem kui asoksüstrobiiniga koos (Mavroeidi, Shaw, 2006). Praeguses asoksüstrobiini ja sulfoksafloori uuringus väikesed annused pestitsiide, aga ei mõjutanud algul nii palju, kui suured annused asoksüstrobiini ja sulfoksafloori segud. Hiljem, aga vähenes koosmõju toksilisus. Pestitsiide on katsetatud ka kilpnäärmehormooniga, kus pestitsiidid parandasid selle võimet seonduda retseptoriga. Pestitsiididel aga osutus olema erinev sidumisviis, mis näitas agonistlikku ja antagonistlikku toimet (Xiang jt, 2017). Asoksüstrobiini on katsetatud ka herbitsiidiga isoprotoom, kus leiti, et neil on antagonistlik efekt *Skeletonema marinoi* puhul (Dupraz jt, 2019).

Seda kas asoksüstrobiini antagonistlik mõju ka kimalase organismi terviklikule toimimisele kasulik on, ei oska käesoleva uurimuse põhjal öelda. Asoksüstrobiini mõjust pole palju uuringuid tehtud kimalaste peal, küll aga leidub uuringuid rohkem meemesilastega. Fungitsiididega kokkupuutumine on mõnel juhul mesilastel kaasa toonud geneetilisi ja molekulaarseid muutusi (Belsk, Joshi, 2020). Selgunud on, et asoksüstrobiin suudab meemesilastes subletaalsetes kontsentratsioonides kutsuda esile transkriptsioonilisi muutusi geenides, mis kodeerivad ensüüme, osalevad oksüdatiivses fosforüülimises ja ainevahetuses (Christen jt, 2019). Tamburini jt (2021) katses aga asoksüstrobiin ei mõjutanud meemesilasi suures ulatuses.

Insektitsiide kasutatakse kahjuriputukate peletamiseks, mis suurendab kultuurtaimede saagikust. On tõendeid selle kohta, et neonikotinoidid on mesilasliikide suhtes kahjulikud ja osad on selle tõttu ära keelustatud. See on toonud turule uued sulfoksimiinsed insektitsiidid (Brown jt, 2016). Samas, mõned autorid väidavad, et nii mõnedki uued neurotoksiinid tuleks liigitada neonikotinoidide hulka (Giorio jt, 2017), kuna nad kasutavad ära samu neuroniretseptoreid (Sparks jt, 2013). Neonikotinoididele sarnaselt, on sulfoksafloor süsteemne insektitsiid, mis levib kogu töödeldud põllukultuuris ja võib saastada nende õietolmu ja nektarit (EFSA, 2020; Giorio jt, 2017). Tänapäeval on nende toimeained tõhusamad ja ohutumad, aga on leitud, et mitme aasta jooksul tehtud uuringutes sulfoksimiine insektitsiid võib olla tolmeldajatele sama kahjulik, kui neurotoksiinid (EFSA, 2020).

Suurema osa katseid on ainult läbi tehtud laborites ja mitte põldudel ning asoksüstrobiini ja sulfoksafloori kokkusattumist avamaal ei ole teada, aga oletada saab, et nad võivad kokku

sattuda. Näitena saab tuua seda, et sulfoksafloori kasutatakse brokoli peale ühe korra 16-41 kasvufaasis ning ooteajaks on 14 päeva. Asoksüstrobiini kasutatakse 35-39 kasvufaasis ja ooteajaks on samuti 14 päeva. Mida varem sulfoksafloori kasutada, seda vähe tõenäolisem on, et need pestitsiidid kokku puutuvad. Kuid omakorda, kui mingitel tingimustel pole varem võimalik kasutada ja hoopis hiljem põllule minna (35-41 kasvufaasid) (EFSA, 2020; Põllumajandus- ja Toiduamet, 2021), seda suurem tõenäosus on, et need pestitsiidid satuvad kokku.

KOKKUVÕTE

Inimestel on olnud vajadus arendada mitmeid pestitsiide toiduainete, kariloomade ja tervise kaitsmiseks. Ilmselgelt, kui saaks, siis ei kasutataks üldse pestitsiide. Omakorda on tekkinud sõltuvus nende kasutamisel ja see on toonud kaasa resistentsusi, mis on toonud kaasa ka vajadust veel rohkem pestitsiide kasutada. Neonikotinoidid on osaliselt või täielikult keelustatud ja võimalus nende asendamiseks on kasutusele võtta sulfoksafloor. Samuti võttes perspektiivi teised pestitsiidid, mis võiksid esineda põldudel, saaks aimu, mis mõju nad keskkonnale koos tekitavad. Tehtud katse eesmärgiks oli leida sulfoksafloori ja asoksüstrobiini mõju ja koosmõju kimalaste suremusele ja toitumisele ning teha kindlaks, kas nende ainete võimalik mõju üksteise toimele on mõlema uurimisküsimuse suhtes samasugune.

Katsed viidi läbi Eesti Maaülikooli taimekaitse laboris. Katses kasutati karukimalaste (*Bombus terrestris*) töölisi, keda töödeldi individuaalselt erinevate lahustega, mis sisaldasid insektitsiidi sulfoksafloor ja fungitsiidi asoksüstrobiin ning nende segusid. Negatiivse kontrollina kasutati atsetooni ja positiivse kontrollina dimetoaati.

Tulenevalt uuringust on asoksüstrobiini mõju kimalaste suremusele ja toitumisele puudulik, aga koosmõju insektitsiididega nagu näiteks sulfoksafloor muudavad teineteist ümbritsevaga toksilisemaks ja hiljem nõrgemaks. Aja jooksul fungitsiid vähendab insektitsiidi toimet ehk tekib antagonistlik efekt. Asoksüstobiin muudab sulfoksafloori mõju antagonistlikult ainult madalamatel doosidel (5-20 µg), kuid suurima doosi (50 µg) võimendab mõju, ehk suremus suureneb. Sulfoksafloori kõrgemad doosid toitumise poole pealt vähendasid kimalaste kaalum muutust, aga madalamad doosid ei mõjutanud.

Tulenevalt uuringust mõjutavad pestitsiidid kimalaste suremust ja toitumist olenevalt doosidest. Leitud antagonistlikku efekti ei tohiks aga käsitleda kui kimalaste tervist turgutava vahendina, sest kirjanduses on piisavalt näiteid ka asoksüstrobiini kahjulikust mõjust

mesilastele. Täpsema selguse saamiseks oleks vaja kasutada täpsemaid käitumuslikke või füsioloogilisi analüüse.

SUMMARY

People have had the need to develop a number of pesticides to protect food, livestock, and health. Obviously, if it could, no pesticides would be used at all. In turn, there has been an addiction to their use and this has led to resistance, which has also led to the need for even more pesticides to be used. Neonicotinoids are partially or completely banned and the option to replace them is to introduce sulfoxaflor. Also, taking a perspective on other pesticides that could occur in fields would have an idea of what impact they would have on the environment together. The aim of the test was to find the effects of sulfoxaflor and azoxystrobin individually and in combination with the mortality and nutrition of bumble bees, and to determine whether the potential effects of these substances on each other's effects are similar to those of both research subjects.

The experiments were performed in the plant protection laboratory of the Estonian University of Life Sciences. Bumble bee workers of *Bombus terrestris* were used in the experiment, who were individually treated with different solutions containing the insecticide sulfoxaflor and the fungicide azoxystrobin and mixtures. Acetone was used as a negative control and dimethoate as a positive control.

As a result of the study, the effect of azoxystrobin on the mortality and diet of bumblebees is incomplete, but the interaction with insecticides such as sulfoxaflor makes each other more toxic and later weaker. Over time, fungicide reduces the effect of insecticide, which is an antagonistic effect. Azoxystrobin antagonistically changes the effect of sulfoxaflor only at lower doses (5-20 µg), but the highest dose (50 µg) boosts the effect, i.e. an increase in mortality. Higher doses of sulfoxaflor on the diet side reduced the weight change of the bumblebees, but the lower doses did not affect.

In conclusion, pesticides affect the mortality and nutrition of bumble bees, depending on the dose. However, the antagonistic effect found should not be seen as a health-enhancing tool for

bumblebees, as there are sufficient examples of harmful effects of azoxystrobin on bees in the literature. Advanced behavioural or physiological analyses should be used for further clarity.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aktar, Md.W., Sengupta, D., Chowdhury, A.** 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol* 2: lk 1–12. [veebileht] <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7> (16.04.2021)
- Artz, Derek R., Theresa L. Pitts-Singer,** 2015. Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. *PLOS ONE* 10 (8): e0135688. [veebileht] <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0135688> (20.04.2021)
- Azpiazu, C., Bosch, J., Bortolotti, L., Medrzycki, P., Teper, D., Molowny-Horas, R., Sgolastra, F.** 2021. Toxicity of the insecticide sulfoxaflor alone and in combination with the fungicide fluxapyroxad in three bee species. *Scientific Reports* 11, 1 6821. [veebileht] <https://www.nature.com/articles/s41598-021-86036-1> (20.05.2021)
- Bacci, L., Convertini, S., Rossaro, B.** 2018. A review of sulfoxaflor, a derivative of biological acting substances as a class of insecticides with a broad range of action against many insect pests. *Journal of Entomological and Acarological Research* 50 (3): [veebileht] <https://www.pagepressjournals.org/index.php/jear/article/view/7836> (16.04.2021)
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., Parr- Dobrzanski, B.** 2002 The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58 (7): lk 649–62. [veebileht] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2020.00081/full> (16.04.2021)
- Becker WF von Jagow G Anke T Steglich W.** 1981. Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B, and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an E- β -methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS* 132: lk. 329–333 [veebileht] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6271595/> (20.04.2021)
- Belsky, J., Neelendra K. J.** 2020. Effects of fungicide and herbicide chemical exposure on *Apis* and *non-Apis* bees in agricultural landscape. *Frontiers in Environmental Science* 8 [veebileht] <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00081>.
- Boff, S., Scheiner, R., Raizer, J., Lupi, D.** 2021. Survival rate and changes in foraging performances of solitary bees exposed to a novel insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211:

111869. [veebileht] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765132031705X> (20.04.2021)
- Bolognesi, C., Merlo, F.D.** 2019. Pesticides: Human Health Effects. *Encyclopedia of Environmental Health* (Second Edition): lk. 118–132. [veebileht] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095489118184> (24.04.2021)
- Brown, M. J. F., Dicks, L. V., Paxton, R. J., Baldock, K. C. R., Barron, A. B., Chauzat, M. P., Freitas, B. M. jt.** 2016. A horizon scan of future threats and opportunities for pollinators and pollination. *PeerJ* 4: e2249. [veebileht] <https://peerj.com/articles/2249> (16.04.2021)
- Buhl, V.** 2010. Karukimalane (*Bombus terrestris* L.). [veebileht] [https://et.wikipedia.org/wiki/Fail:2010-04-28_\(35\)_Erdhummel,_Buff-tailed_bumblebee,_Bombus_terrestris.jpg](https://et.wikipedia.org/wiki/Fail:2010-04-28_(35)_Erdhummel,_Buff-tailed_bumblebee,_Bombus_terrestris.jpg) (20.04.2021)
- Bumblebee Nests - Bumblebee Conservation Trust. 2021. [veebileht] <https://www.bumblebeeconservation.org/bumblebee-nests/> (25. 05. 2021)
- Buttermore, R. E.** 1997 Observations of successful *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in southern Tasmania. *Austral. J. Entomol.* 36: lk 251–254. [veebileht] <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1440-6055.1997.tb01463.x> (20.04.2021)
- Casida, J.E.** 2017. Pesticide interactions: mechanisms, benefits, and risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, lk 4553–4561. [veebileht] <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01813> (25. 05. 2021)
- Cheng, Y. jt.** 2018. A semi-field study to evaluate effects of sulfoxaflor on honey bee (*Apis mellifera*) *Bull Insectol* 71:225–233. [veebileht] <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol71-2018-225-233cheng.pdf> (21.05.2021)
- Christen, V., Krebs, J., Fent, K.** 2019. Fungicides chlorothanolin, azoxystrobin and folpet induce transcriptional alterations in genes encoding enzymes involved in oxidative phosphorylation and metabolism in honey bees (*Apis mellifera*) at sublethal concentrations. *Journal of Hazardous Materials* 377. [veebileht] <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.056> (20.04.2021)
- Cnaani, J., Schmid-Hempel, P., Schmidt, J.** 2002. Colony development, larval development and worker reproduction in *Bombus impatiens* Cresson. *Insectes Sociaux - INSECTES SOC* 49: lk. 164–170. [veebileht] <https://doi.org/10.1007/s00040-002-8297-8> (24.04.2021)

- Damalas, C., A., Eleftherohorinos, I. G.** 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (5): lk. 1402–1419. [veebileht] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3108117/> (16.04.2021)
- Das, S., Mondal, T.** 2014. Mode of action of herbicides and recent trends in development: a reappraisal. *Int. J. Agric. Soil Sci.* 2, lk. 27–32. [veebileht] https://www.researchgate.net/profile/Shاون_Das4/publication/303130418_Mode_of_action_of_herbicides_and_recent_trends_in_development_a_reappraisal/links/5b61a7efaca272a2d679787a/Mode-of-action-of-herbicides-and-recent-trends-in-development-a-reappraisal.pdf (20.04.2021)
- Dawoud, M., Bundschuh, M., Goedkoop, W., McKie, B. G.** 2017. Interactive effects of an insecticide and a fungicide on different organism groups and ecosystem functioning in a stream detrital food web. *Aquatic Toxicology* 186: lk. 215–21. [veebileht] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X17300784> (16.04.2021)
- Dayan, F., Barker, A., Bough, R., Ortiz, M., Takano, H., Duke, S.** 2019. Herbicide mechanisms of action and resistance. lk. 23–35. [veebileht] <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00211-1> (26.04.2021)
- Dupraz, V., Ménard, D., Akcha, F., Budzinski, H., Stachowski-Haberkorn, S.** 2019. Toxicity of binary mixtures of pesticides to the marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema Marinoi*: substance interactions and physiological impacts. *Aquatic Toxicology* 211: lk. 148–62. [veebileht] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X18309913> (24.04.2021)
- Simon-Delso, N., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J. M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan, jt.** 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (1): lk. 5–34. [veebileht] <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>. (16.04.2021)
- Doble, M., Kumar, A.** 2005. Biodegradation of pesticides. *Biotreatment of Industrial Effluents* 8: lk. 89–100. [veebileht] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780750678384500099?via%3Dihub> (20.05.2021)
- EFSA, Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Brancato, A., Bura, L., Cabrera, L. C., Chaideftou, E. jt.** 2020. Peer review of the pesticide risk assessment for the active substance

- sulfoxaflor in light of confirmatory data submitted. *EFSA Journal* 18 (3): e06056. [veebileht] <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6056>. (20.05.2021)
- Fisher, A., Coleman, C., Hoffmann, C., Fritz, B., Rangel, J.** 2017. The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) forager survival. *Journal of economic entomology* 110. [veebileht] <https://doi.org/10.1093/jee/tox031>. (16.04.2021)
- Giorio, C., Safer, A., Sánchez-Bayo, F., Tapparo, A., Lentola, A., Girolami, V., van Lexmond, M.B., Bonmatin, J.-M.** 2017. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. *Environmental Science and Pollution Research*, lk. 1–33 [veebileht] <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-0341-3#ref-CR130> (01.05.2021)
- Goka, K.** 2010. Introduction to the special feature for ecological risk assessment of introduced bumblebees: Status of the European bumblebee, *Bombus terrestris*, in Japan as a beneficial pollinator and an invasive alienspecies. *Applied Entomology and Zoology* 45 (1): 1–6. [veebileht] https://www.jstage.jst.go.jp/article/aez/45/1/45_1_1/_article (16.04.2021)
- Goka, K., Okabe, K., Yoneda, M., Niwa, S.** 2001. Bumblebee commercialization will cause world wide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology*. 10: 2095–2099. [veebileht] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11555253/> (16.04.2021)
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E. L.** 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347 :1255957. [veebileht] <https://doi.org/10.1126/science.1255957> (20.05.2021)
- Halifman, J.,** (tõlkinud Metsar, J.) 1978. Kimalased, lk. 116–125 (16.04.2021)
- Hingston, A. B., McQuillan, P. B.** 1998. Nectar robbing in *Epacris impressa* (*Epacridaceae*) by the recently introduced bumblebee *Bombus terrestris* (*Apidae*) in Tasmania. *Victorian Naturalist* 115: 116–119. [veebileht] <http://ecite.utas.edu.au/13910> (20.04.2021)
- Iverson, A., Hale, C., Richardson, I., Miller, O., McArt, S.** 2019. Synergistic effects of three sterol biosynthesis inhibiting fungicides on the toxicity of a pyrethroid and neonicotinoid insecticide to bumble bees. *Apidologie* 50. [veebileht] <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00681-0> (20.05.2021)
- Joseph, R. S. I.** 1999 Metabolism of azoxystrobin in plants and animals. *Pesticide Chemistry and Bioscience*. lk. 265–278. [veebileht] <https://doi.org/10.1533/9781845698416.6.265>. (20.05.2021)

- Knight, A. L., ja Norton, G. W.** 1989. Economics of agricultural pesticide resistance in arthropods. *Annual Review of Entomology* 34 (1): lk. 293–313. [veebileht] <https://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.001453>. (16.04.2021)
- Ladurner, E., Bosch, J., Kemp, W., Maini, S.** 2005. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. *Apidologie* 36 (3): lk. 449–460. [veebileht] <https://doi.org/10.1051/apido:2005032>. (24.04.2021)
- Liiskmann, E.** 2020. Sulfoksafloori mõju karukimalase (*Bombus terrestris* L.) emadele, töölistele ja isastele. Magistritöö. Eesti Maaülikool. [veebileht] <https://dspace.emu.ee/handle/10492/5813>. (20.05.2021)
- Long, E., Krupke, C.** 2016. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. *Nature Communications* 7 : 11629. [veebileht] <https://doi.org/10.1038/ncomms11629>. (20.04.2021)
- Maaeluministeerium. 2021. Taimekaitsevahendite jäägid [veebileht]: <https://www.agri.ee/et/taimekaitsevahendite-jaagid>. (15.05.2021)
- Mavroeidi, V. I., Shaw M. W.** 2006. Effects of fungicide dose and mixtures on selection for triazole resistance in *Mycosphaerella graminicola* under field conditions. *Plant Pathology* 55 (6): lk. 715–725. [veebileht] <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01441.x>. (20.05.2021)
- McArt, S. H., Fersch, A. A., Milano, N. J. jt.** 2017. High pesticide risk to honey bees despite low focal crop pollen collection during pollination of a mass blooming crop. *Scientific Reports* 7 :46554. [veebileht] <https://doi.org/10.1038/srep46554>. (16.04.2021)
- Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L., Ashcraft S., Simonds R., van Engelsdorp D., Pettis J.S.** 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS One*. [veebileht] <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0009754>. (20.04.2021)
- OECD. 2017. Bumblebee, Acute Contact Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. *OECD Publishing* 246 (2). [veebileht] <https://doi.org/10.1787/9789264284104-en>. (20.05.2021)
- Põllumajandus- ja toiduamet. 2021 Taimekaitse. [veebileht]: <https://portaal.agri.ee/avalik/#/taimekaitse/taimekaitsevahendid-otsing/et> (20.05.2021)

- Raimets, R., Karise, R., Mänd, M., Kaart, T., Ponting, S., Song, J., jt.** 2018. Synergistic interactions between a variety of insecticides and an ergosterol biosynthesis inhibitor fungicide in dietary exposures of bumble bees (*Bombus terrestris* L.): synergistic interactions between a variety of insecticides and fungicide. *Pest Management Science* 74: lk. 541–546. [veebileht] doi: 10.1002/ps.4756 (20.05.2021)
- R Core Team (2019) R: A Language and Environment for Statistical Computing. [veebileht]: <https://www.R-project.org/> (20.05.2021)
- Rodrigues, E., Lopes, I., Pardal, M.** 2013 Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review. *Environment international* 53: lk. 18–28. [veebileht] <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.005>. (16.04.2021)
- Sgolastra, F., Medrzycki, P., Bortolotti, L. jt.** 2016. Synergistic mortality between a neonicotinoid insecticide and an ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicide in three bee species. *Pest Management Science* 73: lk. 1236–1243. [veebileht] <https://doi.org/10.1002/ps.4449> (15.05.2021)
- Siviter H, Brown MJF, Leadbeater E.** 2018. Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. *Nature* 561: lk. 109–112. [veebileht] doi: 10.1038/s41586-018-0430-6. (15.05.2021)
- Siviter, H., Horner, J., Brown, M. J. F., Leadbeater, E.** 2019. Sulfoxaflor exposure reduces egg laying in bumblebees *Bombus Terrestris*. *Journal of Applied Ecology* 57 (1): lk. 160–169. [veebileht] <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13519>. (15.05.2021)
- Sparks, T. C., Watson, G. B., Loso, M. R., Geng, C., Babcock, J. M., Thomas, J. D.** 2013. Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107 (1): lk. 1–7. [veebileht] <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.05.014>. (16.04.2021)
- Syngenta. 2021. Amistar 250 SC. [veebileht]: <https://www.syngenta.ee/product/crop-protection/fungitsiid/amistar> (20.04.21).
- Tamburini, G., Wintermantel, D., Allan, M., Dean, R., Knauer, A., Albrecht, M., Klein, A.** 2021. Sulfoxaflor insecticide and azoxystrobin fungicide have no major impact on honeybees in a realistic-exposure semi-field experiment. *Science of The Total Environment* 778: 146084. [veebileht] <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146084>. (15.05.2021)

- Thompson, H. M., Hunt, L. V.** 1999. Extrapolating from honeybees to bumblebees in pesticide risk assessment. *Ecotoxicology* 8 (3): lk. 147–166. [veebileht] <https://doi.org/10.1023/A:1026444029579>. (16.04.2021)
- Viik, E., Mänd, M.** (2012) Eesti kimalased. Põllumajandusuuringute Keskus. (10.05.2021)
- Viik, E., Mänd, M.** (2017) Eesti kimalased. Põllumajandusuuringute Keskus. (10.05.2021)
- Wei, F., Wang, D., Li, H., You, J.** 2021. Joint toxicity of imidacloprid and azoxystrobin to *Chironomus dilutus* at organism, cell, and gene levels. *Aquatic Toxicology* 233: 105783. [veebileht] <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105783>. (20.05.2021)
- Wheeler, M. N., Johnston, B. R.** 2013. Fungicides: Classification, role in disease management and toxicity effects. *Nova Science Publication Incorporated*. lk 121. (24.05.2021)
- Xiang, D., Han, J., Yao, T., Wang, Q., Zhou, B., Mohamed, A. D., Zhu, G.** 2017. Structure-based investigation on the binding and activation of typical pesticides with thyroid receptor. *Toxicological Sciences* 160 (2): 205–216. [veebileht] <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx177>. (20.05.2021)

LISAD

Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks (avaldamise tähtajaline piirang) ning juhendajate kinnitus töö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Maribel Rohesalu,
sünniaeg 03. märts 1999,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö

Pestitsiidide sulfoksafloori ja asoksüstrobiini mõju ja koosmõju karukimalase (*Bombus terrestris* L.) tööliste,

mille juhendajad on Margret Jürison ja Reet Karise,

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks pärast tähtajalise piirangu lõppemist kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Maribel Rohesalu

/digitaalselt allkirjastatud/

Tartu, 25. mail 2021

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

Margret Jürison 25. mail 2021

/digitaalselt allkirjastatud/

Reet Karise 25. mail 2021

/digitaalselt

allkirjastatud